

RIDA[®] QUICK Campylobacter

Art. N°.: N2403



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Alemanha
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Fax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Âmbito de aplicação

Para o diagnóstico *in vitro*. O RIDA®QUICK Campylobacter é um teste rápido qualitativo de imunocromatografia para determinação de antígenos de Campylobacter jejuni e Campylobacter coli em amostras de fezes e em culturas.

2. Resumo e explicação do teste

A campilobacteriose representa atualmente no mundo, em conjunto com a salmonela, uma das doenças diarreicas associadas aos alimentos mais comuns nas pessoas. A elevada frequência da enterite por Campylobacter é favorecida pela grande presença abrangente da espécie da bactéria entre os animais selvagens, de trabalho e domésticos (aves e mamíferos).

Como comensais no trato intestinal das aves, as bactérias são transportadas à cadeia alimentar dos humanos, principalmente através destes animais. Mas também outros alimentos como o leite, a carne picada e água potável são veículos para a transmissão do agente patogénico. O Campylobacter é transportado pelos parasitas em grandes quantidades para o meio ambiente, e alcança as pessoas através de alimentos contaminadas. Mas também o contacto direto com animais domésticos doentes de campilobacteriose, assim como o contacto oral ou fecal, particularmente em crianças, são meios possíveis de transmissão da enterite por Campylobacter. A dose de infeção com 500 germes é relativamente baixa. Das 15 espécies conhecidas de Campylobacter, o C. jejuni e C. coli são os principais causadores da gastroenterite nos humanos. Após um tempo de incubação de 2 a 10 dias, os doentes não tratados expelem os agentes patogénicos por um período de 4 semanas nas fezes. No caso de imunodeficiência, pode ocorrer uma segregação permanente. Enquanto muitas infeções ocorrem assintomaticamente, nos doentes observa-se uma fase prodrómica com febre, dores de cabeça, mialgias, artralgias e cansaço, os típicos sintomas da enterite com diarreia, câibras e dores abdominais. As diarreias são de consistência pastosa a massiva, aguadas e, ocasionalmente, acompanhadas de sangue. Artrites e a rara síndrome de Guillain-Barré são as consequências futuras da doença. A terapia é geralmente sintomática através de substituição de líquidos e eletrólitos e, somente em casos mais difíceis, com tratamento com antibióticos. A cultura bem-sucedida do agente patogénico sensível das amostras de fezes, de preferência recentes, exige um transporte de curta duração ou em meio refrigerado. Independentes disto são os processos modernos de deteção de antígeno, como o presente RIDA®QUICK Campylobacter Teste Rápido, que também deteta os antígenos específicos de Campylobacter nas amostras de fezes, quando os agentes patogénicos já não podem ser cultivados.

3. Princípio do teste

O presente teste rápido é um teste de fluxo lateral imunocromático realizado num único estágio, que utiliza tanto anticorpos anti Campylobacter biotinilados como marcados a ouro.

Sempre uma amostra positiva conter o agente patogénico, os anticorpos marcados anti *Campylobacter* formam imunocomplexos, que passam, de seguida pela membrana. A estreptavidina existente na linha de teste T liga os imunocomplexos afluentes através da biotina acoplada ao anticorpo anti *Campylobacter*, e causa, por consequência, uma coloração vermelha/roxa da linha T. Na linha de controlo C seguinte ligam-se os anticorpos de passagem sem complexo, marcados a ouro. Nas amostras negativas, por conseguinte, a ligação de imunocomplexos marcados a ouro não se realiza na linha T, mas apenas na linha C. A linha C vermelha indica sempre se a realização do teste foi válida.

4. Conteúdo da embalagem

Os reagentes de uma embalagem são suficientes para 25 doses

Cassete	25 doses	25 cartuchos de teste embalados individualmente
Reagent A	13,5 ml	Anticorpos anti- <i>Campylobacter</i> específicos; contém 0,05 % de azida, pronto a usar, de cor azul
Reagent B	13,5 ml	Anticorpos anti- <i>Campylobacter</i> específicos; contém 0,05 % azida, pronto a usar, de cor amarela
Pipette	50 unidades	Embalagem com 50 pipetas multifuncionais, graduadas para pipetagem de espécimes líquidos com uma espátula para medição de amostras de fezes sólidas
Reagent vial	25 unidades	Embalagem com 25 tubos de ensaio

5. Reagentes e a sua armazenagem

A embalagem pode ser armazenada a 2 – 25 °C e deve ser usada até ao prazo de validade impresso. Após expirado o prazo de validade, não pode ser oferecida nenhuma garantia de qualidade. Da mesma forma, também a capacidade de uso dos cartuchos não pode ser garantida, se a embalagem dos mesmos se encontrar danificada.

6. Reagentes adicionais necessários – equipamento necessário

- Misturador Vórtex (opcional)
- Contentor de lixo com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%

7. Medidas de precaução

Apenas para o diagnóstico *in vitro*.

Este teste só deve ser efetuado por pessoal de laboratório qualificado. As diretivas de trabalho nos laboratórios médicos devem ser respeitadas. As instruções de uso para realização dos testes devem ser rigorosamente cumpridas.

Os reagentes contêm azida de sódio como conservante. Deve-se evitar o contacto com a pele ou as mucosas.

Não pipetar as amostras ou reagentes com a boca; evitar o contacto com a pele ferida ou mucosas. Durante o contacto com amostras, devem ser utilizadas luvas de uso único, e após o término dos testes deve-se lavar as mãos. Nas áreas em que se trabalha com amostras ou reagentes de teste não fumar, comer ou beber.

Todos os materiais e reagentes, que tenham entrado em contacto com as amostras potencialmente infecciosas, têm de ser tratados igualmente como as amostras, ou seja, com desinfetantes adequados (p.ex., hipoclorito de sódio) ou autoclavadas pelo menos durante uma hora a 121 °C.

8. Colheita e armazenagem das amostras

As amostras de fezes devem ser colhidas em recipientes limpos sem aditivos e armazenadas antes do teste a 2 – 8 °C. No caso de uma amostra com mais de 3 dias, a amostra deve ser congelada a - 20 °C. Neste caso, a amostra é descongelada totalmente antes do teste e exposta a temperatura ambiente. Deve-se evitar o congelamento e descongelamento repetido da amostra.

Caso sejam utilizadas colheitas anais, deve-se ter em atenção que o material de fezes deve estar disponível em quantidade suficiente (aprox. 50 mg), para realização do teste.

9. Realização do teste

9.1. Disposições gerais

Todas as amostras, reagentes, assim como os cartuchos de teste, devem ser colocados a temperatura ambiente (20 – 25 °C), antes da sua utilização. Os cartuchos de teste só devem ser retirados da embalagem original, pouco antes da sua utilização. Os cartuchos de teste não devem ser utilizados mais do que uma vez. Deve ser evitada a luz direta do sol durante a realização do teste. O reagente restante não deve ser colocado novamente nos tubos de Eppendorf, dado que poderia causar uma contaminação.

9.2. Preparação das amostras

Antes de usar, todas as amostras de fezes devem ser muito bem misturadas, para garantir a distribuição homogênea dos antígenos.

Indicação:

Para cada teste da amostra, existem duas pipetas Pipette disponíveis para serem usadas da seguinte forma:

Pipeta 1: para pipetagem de Reagente A Reagent | A e o espécime (50 µl ou 50 mg com a espátula dependendo da consistência da amostra).

Pipeta 2: para pipetagem do Reagente B Reagent | B e a mistura do Reagente A e B e a amostra.

9.3. Teste da amostra

Em um tubo de ensaio etiquetado **Reagent vial**, pipete 0,5 ml de Reagente A **Reagent A** usando a **Pipeta 1** e 0,5 ml de Reagente B **Reagent B** usando a **Pipeta 2**. Adicione a amostra de fezes homogeneizada de 50 mg da **Pipeta 1** com a espátula (observe a marcação na espátula) ou 50 µl (primeira graduação na pipeta), dependendo da consistência a essa mistura de reagente. Vede bem o tubo de ensaio e agite bem o conteúdo para misturar (opcionalmente: usar o vórtice). Coloque o tubo de ensaio no kit de teste pelo menos por 5 min. Durante esse período, a amostra reage com a mistura do reagente, enquanto os componentes das fezes sólidas são depositados como sedimento. Nesse ínterim, retire a bandeja de teste a temperatura ambiente **Cassette** da embalagem e posicione-a em uma superfície nivelada. Assim que os 5 minutos do tempo de reação passarem, abra com cuidado o recipiente de reação e use a **Pipeta 2** para remover 150 µl (segunda graduação na pipeta) do sobrenadante clarificado, e pipete-o no funil da amostra na borda da bandeja. Certifique-se de que o fluido possa escorrer pela membrana sem obstrução. Se realizado corretamente, a faixa de controle aparece na linha de controle C após aproximadamente 3 minutos. Se a linha de controle não estiver visível após 3 minutos, o tubo de ensaio precisa ser fechado novamente centrifugado por 2 min a 2000 x g, para sedimentar qualquer partícula sólida problemática. Depois disso, pipete 150 µl do sobrenadante no funil da amostra da bandeja nova. Leia o resultado do teste após **15 minutos**. Durante todo o tempo do desenvolvimento, e após secagem das tiras, a coloração e a intensidade das faixas pode mudar de vermelha-violeta para cinza-violeta.

9.3.1. Utilização de culturas líquidas e sólidas de Campylobacter

São pipetados e misturados 50 µl de um **caldo nutriente** (p.ex., caldo Bolton) em 1,0 ml da mistura de reagentes, formada pelo reagente A (0,5 ml) e reagente B (0,5 ml), previamente preparada no tubo de Eppendorf. Desta mistura são utilizados 150 µl para o teste das amostras (ponto. 9.3.).

Caso sejam utilizados **meios de cultura sólidos**, remove-se o maior número possível de colónias da placa dos meios de cultura, os quais são, num primeiro passo, completamente suspensos numa solução de água destilada de 1 ml ou soro fisiológico (NaCl a 0,9%). São pipetados e misturados 50 µl desta suspensão em 1,0 ml da mistura de reagentes, formada pelo reagente A (0,5 ml) e reagente B (0,5 ml), previamente preparada no tubo de Eppendorf. Desta mistura são utilizados 150 µl para o teste das amostras (ponto 9.3.).

10. Controlo de qualidade – Sinais de expiração do reagente

O teste só deve ser avaliado, se o cartucho de teste estiver intacto antes da pipetagem da suspensão das amostras, e o mesmo não apresentar alterações de cor ou tiras visíveis. Além disso, após o período de incubação de 15 minutos, deve ser pelo menos visível a tira de

controle vermelha/roxa. Se esta não parecer, verifique o seguinte antes de repetir o teste:

- Durabilidade dos cartuchos de teste e dos reagentes utilizados
- Realização correta do teste
- Contaminação dos reagentes

Se após a repetição do teste com um novo cartucho de teste a tira de controle ainda não for visível, contacte o fabricante ou o seu distribuidor local R-Biopharm.

11. Avaliação e interpretação

Só podem aparecer duas tiras no máximo, vistas do campo de aplicação das amostras, na seguinte sequência: uma tira de reação vermelha/roxa na linha de teste T e uma tira de controle vermelha/roxa na linha de controle C. **Se faltar a tira de controle, o teste não pode ser avaliado e torna-se inválido!**

São possíveis as seguintes interpretações:

- **Campylobacter positivo:** ambas as tiras são visíveis.
- **Campylobacter negativo:** apenas a tira de controle é visível.
- **Inválido:** nenhuma tira visível ou configuração diferente da acima referida. Do mesmo modo, as colorações das tiras que só aparecem bastante mais tarde do que após 15 minutos não têm valor diagnóstico e não permitem avaliação.

12. Limites do método

O RIDA[®]QUICK Campylobacter deteta antigénios de Campylobacter em amostras de fezes ou após o seu enriquecimento em culturas de Campylobacter. Em relação entre a intensidade das tiras específicas visíveis e a ocorrência ou gravidade dos sintomas clínicos não pode, no entanto, ser deduzida. **Os resultados alcançados devem ser sempre interpretados em conjunto com o quadro clínico.**

Um resultado **positivo** não exclui a presença de outros agentes patogénicos ou causas infecciosas.

Um resultado **negativo** não exclui uma possível infeção com Campylobacter. Esta pode ter sido causada por uma eliminação intermitente do agente patogénico ou por quantidade insuficiente de antigénio na amostra. Se em termos anamnésicos existir suspeita fundamentada de infeção com o agente patogénico procurado, deve ser analisada uma amostra de fezes adicional do paciente.

Uma amostra de fezes em excesso pode causar uma coloração castanha da tira de teste, a qual acaba por cobrir a coloração vermelha/roxa da tira de teste específica. Nestes casos, é necessário fazer um novo teste com uma quantidade menor de fezes, ou uma suspensão de

fezes mais apurada, através de centrifugação, a fim de verificar se o antigénio de Campylobacter procurado se encontra na amostra, mas que acabou por ser encoberto por uma matriz de fezes em excesso.

13. Características de desempenho

13.1 Qualidade do teste

A capacidade de desempenho do RIDA[®]QUICK Campylobacter teste rápido foi comparada num estudo de Goldstandard, do isolamento de cultura do agente patogénico em mCCDA sob condições microaerófilas. Para tal foram analisadas no RIDA[®]QUICK Campylobacter teste rápido um total de 574 amostras de fezes provenientes do diagnóstico de rotina diário de um laboratório médico.

Os resultados foram resumidos na tabela 1 seguinte.

Tab. 1: Comparação do RIDA[®]QUICK Campylobacter com o isolamento de cultura em placas mCCDA

		Cultura (mCCDA)	
		positivo	negativo
RIDA [®] QUICK Campylobacter	positivo	62	7
	negativo	1	504

Sensitividade:	98,4 %
Especificidade:	98,6 %
Pos. Valor Previsto:	89,8 %
Neg. Valor previsto	99,8 %

13.2 Sensitividade analítica

O limite de deteção analítico foi calculado para o C.jejuni e C.coli separadamente. Este descreve a concentração mais baixa de germes, que no RIDA[®]QUICK Campylobacter ainda pode ser avaliado como tira positiva. Foi calculado a partir de 60 x o procedimento de teste com cartuchos de teste de dois lotes diferentes e 3 contadores diferentes (95% CI), e é de $2,1 \times 10^4$ KBE/ml para o Campylobacter jejuni e $8,5 \times 10^5$ KBE/ml para o Campylobacter coli.

13.3 Precisão

Para determinar a precisão do teste RIDA[®]QUICK Campylobacter foram examinadas a reprodutibilidade intra-ensaio, a reprodutibilidade inter-dia (10 dias), a reprodutibilidade interoperadores (3 operadores) e a reprodutibilidade inter-lote (3 lotes). Para cada exame foram medidas 5 referências em réplicas: uma negativa, duas médias fortemente positivas, duas fracamente positivas. O teste RIDA[®]QUICK Campylobacter mostrou em todas as medições o resultado esperado.

13.4 Atividade cruzada

Vários germes patogênicos do trato intestinal foram examinados com o teste RIDA[®]QUICK Campylobacter teste rápido e não mostraram atividade cruzada. Os exames foram realizados com suspensões de bactérias (10^6 bis 10^9 KBE/ml), com culturas de parasitas (10^7 até 10^9 organismos/ml) e com sobrenadantes de culturas celulares infetadas com vírus. Os resultados constam da seguinte tabela 2. Para além das duas espécies de Campylobacter *C. jejuni* e *C. coli*, nenhum dos outros organismos analisados reagiu no RIDA[®]QUICK Campylobacter teste rápido.

Tab. 2: Reações cruzadas com bactérias patogênicas do trato intestinal

Germe de teste	Origem/fonte	Resultado
Adenovirus	Sobrenadante de cultura infeccioso	negativo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cultura	negativo
Astrovirus	Sobrenadante de cultura infeccioso	negativo
<i>Bacillus cereus</i>	Cultura	negativo
<i>Bacteroides fragilis</i>	Cultura	negativo
<i>Campylobacter coli</i>	Cultura	positivo
<i>Campylobacter fetus</i>	Cultura	negativo
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cultura	positivo
<i>Campylobacter lari</i>	Cultura	negativo
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	Cultura	negativo
<i>Candida albicans</i>	Cultura	negativo
<i>Citrobacter freundii</i>	Cultura	negativo
<i>Clostridium difficile</i>	Cultura	negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	Cultura	negativo
<i>Clostridium sordellii</i>	Cultura	negativo

<i>Cryptosporidium muris</i>	Cultura	negativo
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cultura	negativo
<i>E. coli</i> (O26:H-)	Cultura	negativo
<i>E. coli</i> (O6)	Cultura	negativo
<i>E. coli</i> (O157:H7)	Cultura	negativo
<i>Enterobacter cloace</i>	Cultura	negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cultura	negativo
Giardia lamblia Probe	Amostra de fezes	negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cultura	negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	Cultura	negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cultura	negativo
Rotavirus	Sobrenadante de cultura infeccioso	negativo
<i>Salmonella enteritidis</i>	Cultura	negativo
<i>Salmonella typhimurium</i>	Cultura	negativo
<i>Serratia liquefaciens</i>	Cultura	negativo
<i>Shigella flexneri</i>	Cultura	negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cultura	negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Cultura	negativo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cultura	negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cultura	negativo

14. Substâncias de interferência

As seguintes substâncias designadas não mostraram qualquer efeito sobre os resultados dos testes, quando foram misturadas nas concentrações apresentadas de amostras de fezes positivas e negativas contaminadas por *Campylobacter jejuni* ou *Campylobacter coli*:

Sulfato de bário (5 % w/w), Loperamida (antidiarreico; 5 % w/w), Pepto-Bismol (antidiarreico; 5 % v/w), Muzin (5 % w/w), Ciclamato (adoçante artificial 5 % v/w), sangue humano (5 % v/w), Ácido esteárico / Ácido palmítico (mistura 1:1, 40 % w/w), Metronidazol 0.5 (antibiótico 5 % v/w), Diclofenac (0.00263 % v/w).

Literatura

1. Skirrow MB, Blaser MJ (1995): *Campylobacter jejuni*. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL (eds) *Infections of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, 825 – 248.
2. Kist M, Bereswill S (2001) *Campylobacter jejuni*. In: Mühldorfer I, Schäfer KP (eds) *Emerging bacterial pathogens. Contrib Microbiol Vol.8*. Karger, Basel, 150 –165.
3. Skirrow MB (1977) *Campylobacter enteritis: a new disease*. *Br Med J* 2: 9 –11.
4. Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Highes RA (1995) *Campylobacter jejuni* infection and Guillain-Barré syndrome. *N Engl J Med* 333: 1374 – 1379.
5. Beumer RR, Cruysen JJ, Birtantie IR (1988) The occurrence of *Campylobacter jejuni* in raw cows milk. *J Appl Bacteriol* 65: 93 – 96.
5. Jones K (2001) *Campylobacters in water, sewage and the environment*. *J Appl Microbiol* 90: 68 S - 79 S
7. Skirrow MB, Turnbull GL, Walker RE, Young SEJ (1980) *Campylobacter jejuni* enteritis Transmitted from cat to man. *Lancet* 1: 1188.
8. Steinbrückner B, Härter G, Pelz K, Kist M (1999) Routine identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human stool samples. *FEMS Microbiol Lett* 179: 227 – 232.
9. Kist M (2002) Lebensmittelbedingte Infektionen durch *Campylobacter*. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch- Gesundheitsschutz* 45: 497 –506.